Die biologische Bedeutung der C_4-Dicarbonsäuren.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
im November 1937
von

Hans W a l c h
aus München.

Berichterstatter: Geheimrat Prof. Dr.H.Wieland.
Tag der mündlichen Prüfung: 9.Dezember 1937.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus Liebigs Annalen der Chemie 525. Band (1936).

Die anaerobe Vergärung der Fumarsäure. Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. XLV;

von *Heinrich Wieland*, *Malcolm Crawford* und *Hans Walch*[1]).

Mit 1 Figur im Text.

Als man verarmte Hefe längere Zeit, 20—30 Stunden, unter Luftausschluß mit Fumarat in Berührung ließ, beobachtete man vollständige Umsetzung der Fumarsäure, aus der zu beinahe 50 Proc. *Bernsteinsäure* entstand. In einigen Ansätzen jedoch blieb die Fumarsäure unter den gleichen Bedingungen unverändert, und die daraufhin vorgenommene mikroskopische Prüfung der Hefe zeigte, daß sie keimfrei geblieben war. Dagegen hatten sich in der Hefe, von der die Fumarsäure verändert worden war, Bakterien entwickelt, die denn auch als die Urheber der Reaktion erkannt wurden.

Obwohl unser Interesse hauptsächlich dem Mechanismus der Umsetzung der Fumarsäure galt, haben wir uns doch auch bemüht, diese Bakterien kennenzulernen. Sie ließen sich auf Fleischwasser-Agar wie auch in Hefewasser vermehren, jedoch nur, wenn die Keime aus infizierter Hefe entnommen waren. Aus der Luft wurde nie eine Infektion gleicher Art beobachtet, etwa in offen aufbewahrtem Hefewasser oder in anderen Nährlösungen. Es ist deshalb auch unwahrscheinlich, daß die Erreger während unserer Operationen mit Hefe von außen her in die Ansätze hineingelangt waren. Sie scheinen vielmehr, wohl als Sporen, bisweilen bereits in der Hefe enthalten zu sein und unter den für sie günstigen Bedingungen unserer Arbeitsweise zu rascher Entwicklung zu kommen. Bisweilen fehlen sie in der Hefe und in solchen Fällen ist die Hefe ohne besondere Sicherheitsmaßnahmen innerhalb unserer Versuchszeit steril geblieben; mit Fumarat kam es dann zu keiner Reaktion.

Die von H. Walch isolierten Bakterien, die wohl zu den Fäulnisbakterien gehören, bilden zu Anfang des Wachstums kurze Stäbchen,

[1]) Dissertation Universität München.

die sich im Laufe einiger Tage zu längeren Formen entwickeln. In diesem Stadium haben sie die Fähigkeit zur anaeroben Umsetzung von Fumarsäure verloren, die nur bei Verwendung junger Kulturen gelingt.

Die Umsetzung der Fumarsäure, bei der zur Hälfte Bernsteinsäure gebildet wird, kann nur auf dem Weg einer Wasserstoffverschiebung vor sich gehen. Aus den Untersuchungen über die dehydrierenden Enzyme der Muskulatur ist seit langem bekannt, daß durch ein hydratisierendes Ferment, die *Fumarase*, Fumarsäure zu $^2/_3$—$^3/_4$ in *l-Äpfelsäure* übergeführt wird, im Rahmen eines Gleichgewichts, das unter denselben Bedingungen auch von der Äpfelsäure aus auf dem Wege der Dehydratation erreicht wird. Diese Tatsache berechtigt zu der Annahme, daß auch von den Bakterien in der ersten Phase aus Fumarsäure *Äpfelsäure* gebildet wird[1]) (I). Als weiterer Gang der anaeroben Abbaureaktion ergibt sich dann die enzymatische Dehydrierung der Äpfelsäure mit Fumarsäure als Wasserstoffacceptor unter Bildung von *Bernsteinsäure* und *Oxalessigsäure*[2]) (II).

I. $HO_2C.CH = CH.CO_2H \xrightarrow{H_2O} HO_2C.CHOH.CH_2.CO_2H$

II. $HO_2C.CHOH.CH_2.CO_2H + HO_2C.CH = CH.CO_2H$
$\longrightarrow HO_2C.CO.CH_2.CO_2H + HO_2C.CH_2.CH_2.CO_2H.$

Das Salz der Oxalessigsäure — es handelt sich hier immer um Reaktionen der neutralen Salze — spaltet unter der Wirkung des carboxylatischen Enzyms der Hefe, das durch die Arbeiten von Neuberg bekannt ist, Kohlendioxyd ab (III).

III. $HO_2C.CO.CH_2.CO_2H \longrightarrow HO_2C.CO.CH_3 + CO_2.$

Die gleiche Spaltung widerfährt der Brenztraubensäure (IV),

IV. $HO_2C.CO.CH_3 \longrightarrow HCO.CH_3 + CO_2,$

und der schließlich auftretende *Acetaldehyd* wird unter der Wirkung der Mutase zu *Alkohol* und *Essigsäure* aufgeteilt (V).

V. $2HCO.CH_3 \longrightarrow CH_2OH.CH_3 + HO_2C.CH_3.$

[1]) Diese Fähigkeit muß auch der Hefe zukommen, da sie Fumarsäure aerob abzubauen vermag. Aus dem Umstand, daß Fumarsäure von Hefe anaerob nicht merklich verändert wird, ist zu schließen, daß hier das Gleichgewicht sich sehr langsam einstellt.

[2]) Wir formulieren die Oxalessigsäure der Übersichtlichkeit wegen in der Ketoform.

Faßt man die Einzelreaktionen I—V summarisch zusammen, so ergibt sich als Bilanz die Gleichung VI.

VI. $4HO_2C.CH = CH.CO_2H \xrightarrow{3H_2O} 2HO_2C.CH_2.CH_2.CO_2H + 4CO_2 + CH_2OH.CH_3 + HO_2C.CH_3$.

Wir haben also einen intermolekularen Abbau der Fumarsäure ohne Wasserstoffacceptor vor uns, durch den ein Viertel des ursprünglich vorhandenen Kohlenstoffs zu CO_2 „verbrannt" ist, natürlich unter Kompensation des Oxydationswertes durch die gleichzeitig gebildete Bernsteinsäure, die wir im Einklang mit Gleichung VI zu etwa 50 Proc. vorfinden.

In quantitativer Hinsicht entspricht aber der Reaktionsverlauf nicht dieser Gleichung. An Kohlendioxyd werden nur 70—75 Proc. der zu erwartenden Menge gefunden, an Alkohol nur 40—45 Proc., während die Essigsäure den ihr zustehenden Anteil mit etwa 40 Proc. (statt 25 Proc.) erheblich überschreitet. Nun entsteht aber neben den in der Gleichung VI enthaltenen Reaktionsprodukten bei der bakteriellen Vergärung von Fumarat stets *Ameisensäure*, und zwar in so großer Menge — etwa 0,2 Mol auf 1 Mol Fumarsäure —, daß man ihr Auftreten als Folge einer zweiten Abbaureaktion zu diskutieren genötigt ist. Wir haben gefunden, daß die Bakterien Brenztraubensäure unter Abspaltung von Ameisensäure zum Teil nach folgender Gleichung zerlegen:

$$HO_2C.CO.CH_3 \xrightarrow{H_2O} HO_2CH + HO_2C.CH_3.$$

Auch aus Oxalessigsäure wird Ameisensäure gebildet, und zwar in größerer Menge als aus Brenztraubensäure:

$$HO_2C.CO.CH_2.CO_2H \longrightarrow HO_2CH + HO_2C.CH_2.CO_2H.$$

Die Tatsache, daß aus den beiden Ketosäuren, die sich als Zwischenprodukte des anaeroben Fumarsäure-Abbaus kaum ausschalten lassen, Ameisensäure entsteht[1]), scheint uns das Auftreten der Ameisensäure ausreichend zu erklären. Die

[1]) Ameisensäure ist vielfach als Produkt der aeroben Vergärung von Zuckern und auch von einfacheren Ausgangsstoffen wie Alkohol, Essigsäure u. a. durch Schimmelpilze angetroffen worden. Man wird auch hier an die Oxalessigsäure als Zwischensubstanz zu denken haben. Aus intermediär gebildeter Oxalessigsäure stammt vielleicht auch die bei Schimmelpilzgärungen so häufig aufgefundene *Oxalsäure*.

gleichzeitig zu erwartende Malonsäure wird als CO_2 und Essigsäure gefunden. Damit wird das Zuviel an Essigsäure — gegenüber dem gebildeten Alkohol — verständlich.

Die anaerobe Reaktion der Äpfelsäure und der Oxalessigsäure.

Wenn die Erklärung für den anaeroben Abbau der Fumarsäure zutrifft, so muß Äpfelsäure die gleiche bakterielle Umwandlung erfahren wie sie. Die Versuche mit Äpfelsäure haben im wesentlichen zu den gleichen Ergebnissen geführt wie diejenigen mit Fumarsäure. Es wurden auch hier rund 50 Proc. des Einsatzes an Bernsteinsäure, außerdem CO_2, Alkohol, Essigsäure und Ameisensäure als Reaktionsprodukte isoliert. Dies gilt für die natürliche l(−)-Äpfelsäure, die mit etwa derselben Geschwindigkeit umgesetzt wird wie Fumarsäure. Dagegen verläuft die Reaktion mit d,l-Äpfelsäure viel langsamer, und es ist die l-Komponente, die bevorzugt umgesetzt wird. Da mehr d(+)-Äpfelsäure unverändert bleibt, so wird der Effekt einer partiellen Spaltung des Racemats erzielt. Die geringere Reaktionsgeschwindigkeit des Racemats ist nicht die Folge der geringeren Konzentration der Lösung an der reaktionsfähigeren l-Form, vielmehr bewirkt die d-Komponente eine ausgesprochene Hemmung gegenüber dem auf die l-Komponente spezifisch eingestellten Enzym. Beobachtungen analoger Art sind zuerst von Willstätter, Kuhn und Bamann[1]) bei der Leberesterase des Schweins gemacht und aus der größeren Affinität des langsamer spaltbaren Antipoden zur aktiven Oberfläche des Enzyms erklärt worden. Eine derartige Erklärung dürfte auch für die bei der konfigurationsspezifischen Dehydrierung der Äpfelsäure angetroffenen Verhältnisse gültig sein.

Oxalessigsäure wird als Natriumsalz von den aus Hefe gezüchteten Bakterien sehr rasch anaerob abgebaut (vgl. Figur, S. 126). Auch bei dieser Reaktion wird *Bernsteinsäure* gebildet, hier nur in einer Menge von etwa 25 Proc. der Ausgangssubstanz.

[1]) B. **61**, 886 (1928); vgl. auch Schwab, Bamann u. Laeverenz, H. **215**, 121 (1933).

Dieser Vorgang erscheint besonders interessant, da er das Prinzip der biologischen Hydrierung und Dehydrierung besonders deutlich veranschaulicht. Über die Zwischenstufen des Weges kann kaum ein Zweifel bestehen: Oxalessigsäure muß zuerst zu Äpfelsäure hydriert werden, von der aus der Prozeß in der oben behandelten Weise weitergeleitet wird. Der zur Hydrierung benötigte Wasserstoff stammt aus einem Produkt der weiteren Spaltung der Oxalessigsäure. Da bei dieser Reaktion im Gegensatz zu derjenigen der Fumarsäure kein Alkohol gefunden wurde, könnte man annehmen, daß es sich um eine Dehydrierung von Acetaldehyd handelt.

$$HO_2C.CO.CH_2.CO_2H + (HO)_2CH.CH_3 \longrightarrow HO_2C.CHOH.CH_2.CO_2H + HO_2C.CH_3.$$

Versuche.

Methodisches zur Isolierung der Bakterien.

Das Wachstum der Bakterien vollzog sich am raschesten in Ansätzen, in denen verarmte Hefe unter Luftausschluß mit Fumarat geschüttelt war. In einer Literflasche wurden z. B. 500 ccm einer Hefesuspension, die 24 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt worden war, mit 40 ccm einer Natriumfumaratlösung, die 4 g Fumarsäure (34,5 Millimol) enthielt, zusammengebracht. Die Flasche wurde evakuiert, mit Stickstoff gefüllt, erneut evakuiert und dann 40 Stunden auf der Maschine geschüttelt. Nach Ansäuern und Abzentrifugieren der Hefe, die zweimal nachgewaschen wurde, engte man auf 100 ccm ein und extrahierte erschöpfend im Perkolator mit Äther. Der krystallisierte Rückstand der Extraktion, 2,225 g, war fast reine *Bernsteinsäure*. Schmelzp. 184°.

0,2225 g: 36,7 ccm $^n/_{10}$-NaOH, ber. 37,6.

Von derselben Menge wurden in der Siedehitze nur 3 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ (schwefelsauer) entfärbt. Es waren also rund 50 Proc. von der eingesetzten Fumarsäure an Bernsteinsäure gebildet.

Während die mikroskopischen Präparate von der frischen wie auch von der verarmten Hefe nur die reinen Hefezellen erkennen ließen, erwies sich die Hefe nach der Umsetzung

mit Fumarat stark mit kurzen Stäbchen vermischt. Bei einzelnen Hefen, die genau in der beschriebenen Weise behandelt wurden, war auch nach 40stündiger Einwirkung keine Veränderung der Fumarsäure eingetreten. Der mikroskopische Befund ließ in diesen Fällen die Hefe keimfrei erscheinen. Diese Beobachtungen wurden in beiderlei Richtung so häufig gemacht, daß die Urheberschaft der Bakterien am Abbau der Fumarsäure außer Zweifel steht.

Zur *Isolierung der Bakterien* impfte man aus einem im Sinne der Infektion positiven Ansatz einen Tropfen der Suspension auf Bouillon-Agar-Platten über. Nach 3 Tagen war die Hefe an der Oberfläche, die Bakterien in der Schicht weiter gewachsen. Auf Hefewasser übertragen erzeugten sie darin schon nach einem Tag starke Trübung. Die auf diesem Wege gezüchteten Bakterien waren gegenüber Fumarat nur wirksam, wenn sie nicht länger als 24 Stunden gewachsen waren. Nach dieser Zeit wurde die trübe Lösung zentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und die aufgeschlemmte Bakterienmasse (etwa 15 mg Trockengewicht) nun mit Fumarat zusammengebracht. (Ältere Kulturen gleicher Art, die 2—3 Tage in Hefewasser gewachsen waren, hatten ihre Aktivität verloren.)

Die anaerobe Reaktion mit Fumarsäure.

2 Millimol Na-fumarat waren in 50 ccm Wasser gelöst; dazu kamen 15—20 ccm der Bakteriensuspension. Es wurde wie oben unter peinlichstem Luftausschluß gearbeitet. Die Reaktionsdauer betrug 15 Stunden.

Die Extraktion mit Äther lieferte 142,7 mg Säure, die zur Neutralisation 23,15 ccm $^n/_{10}$-NaOH verbrauchten. Äquiv.-Gew. 61,6. In der Hitze wurden 8 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$ entfärbt. Die erneute Extraktion dieser Lösung ergab 110,7 mg *Bernsteinsäure* vom Schmelzp. 182,5°; das sind 47 Proc. der eingesetzten Fumarsäure.

Nachdem so an der Bakterien-Reinkultur das Grundsätzliche der Reaktion festgestellt war, bediente man sich für die genauere Ermittlung der Reaktionsprodukte eines einfacheren Verfahrens, die Bakterien zu isolieren. Man impfte einen Tropfen infizierter Hefesuspension auf Hefewasser über und verfuhr mit der nach 24 Stunden getrübten Suspension wie oben geschildert. In einem analogen Versuch, wie er beschrieben ist, wurden 78,4 mg reine Bernsteinsäure erhalten.

Ein größerer Ansatz mit vollständiger Analyse unterrichtete über die Veränderung des Anteils der Fumarsäure, der nicht zu Bernsteinsäure hydriert wird.

10 Millimol Fumarat waren in 500 ccm Wasser, davon etwa $^1/_3$ Hefewasser, gelöst. In diese Lösung brachte man 1 ccm einer Bakteriensuspension, die, aus infizierter Hefe übergeimpft, 24 Stunden lang in Hefewasser gewachsen war. Nach 15 Stunden Stehen bei Raumtemperatur unter Luftausschluß wurde die getrübte Lösung aufgearbeitet.

Das entstandene *Kohlendioxyd* wurde im Gasraum und nach dem Ansäuern der Flüssigkeit mit 2 n-Schwefelsäure auch in der Lösung, in der es als Bicarbonat vorhanden war, bestimmt.

Im Gasraum waren 1,54, in der Lösung 4,81 Millimol enthalten, im ganzen also 6,35 Millimol. An *flüchtigen Säuren* wurden 5,40 Millimol gefunden. Davon waren nach dem Ergebnis einer Bestimmung mit $HgCl_2$ nach Franzen und Egger[1]) 1,55 Millimol *Ameisensäure*, der Rest von 3,85 Millimol *Essigsäure*. An *Alkohol* wurden 2,04 Millimol ermittelt.

Die Menge der mit Äther extrahierten nichtflüchtigen Säure war 0,672 g, in denen nach der Titration mit $^n/_{10}$-NaOH 10,8 Milliäquival. enthalten waren, was also mehr als 50 Proc. Bernsteinsäure entspräche. Das Säuregemisch enthielt auch noch oxydierbare Bestandteile, offenbar Fumarsäure. So verbrauchte ein mit 38,5 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisierter Anteil des Gemisches nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure in der Hitze 28 ccm $^n/_{10}$-$KMnO_4$; das entspräche 4,66 ccm $^n/_{10}$- oder 12,1 Proc. Fumarsäure, auf den ganzen Einsatz bezogen 0,65 Millimol. Aus der oxydierten Lösung wurden — auf das Ganze umgerechnet — 0,507 g Bernsteinsäure (Schmelzp. 179°) mit Äther extrahiert. Das sind 4,29 Millimol.

Den 4,29 Millimol Bernsteinsäure stehen 4,29 Millimol Oxalessigsäure gegenüber. Wenn davon 1,55 Millimol — auf Grund der ermittelten Menge Ameisensäure — in Ameisensäure, CO_2 und Essigsäure zerfallen sind, bleiben 2,74 Millimol für die Reaktion $2CO_2$ + Acetaldehyd(= Alkohol/2 + Essigsäure/2) übrig. Statt 5,48 sind 4,8 Millimol CO_2 gefunden, während von Alkohol und Essigsäure statt 1,37 Millimol 2,04 und 2,30 ermittelt sind. Das Zuviel dürfte in der Hauptsache aus dem Hefewasser stammen.

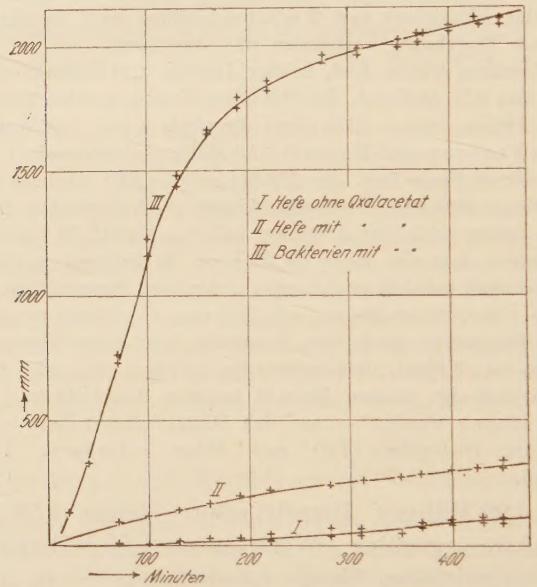
Die weiter unten angeführten Versuche mit insteriler Hefe bestätigen im wesentlichen das mit Bakteriensuspension gewonnene Ergebnis.

Das Verhalten der Bakterien gegen Oxalessigsäure.

Die Geschwindigkeit der Zersetzung von Oxalacetat wurde in gepufferter Lösung (p_H = 6,8, $^m/_{30}$) manometrisch gemessen.

[1]) J. pr. **83**, 323 (1911).

Parallel gingen Ansätze mit Hefe, die 6 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt war. Die Ergebnisse sind im Kurvenbild (vgl. Figur) mitgeteilt, aus dem die große Überlegenheit der Bakterien gegenüber der Hefe hervorgeht.



Die Bakterien waren wieder auf Hefewasser gezüchtet und wurden nach 24 Stunden abgeschleudert und gewaschen. Das Trockengewicht betrug pro Gefäß 14,4 mg, an Na-oxalacetat war die Lösung $^m/_{32}$. Das Trockengewicht der Hefe war jeweils 88,8 mg. In einem Ansatz mit gekochter Hefe unter N_2 kam keine Gasentwicklung zustande.

Präparativer Versuch. 4 Millimol oxalessigsaures Natrium wurden in 100 ccm Lösung mit Bakterien, die nach 16 Stunden aus einer Kultur in Hefewasser abgeschleudert waren (Trockengew. 44,8 mg), $12^1/_2$ Stunden bei Raumtemperatur und unter völligem Luftausschluß (Vakuum) geschüttelt. Die 200 ccm-Flasche, die zum Versuch diente, war mit einem zweifach durchbohrten Gummistopfen, der in jeder Bohrung ein Hahnrohr enthielt, verschlossen.

Das gebildete Gas wurde nicht nur auf CO_2, sondern auch auf *Wasserstoff* analysiert. Zu diesem Zweck wurde es durch einlaufendes Wasser in eine Quecksilber-Gasbürette übergeführt. Es waren 36,6 ccm (23°, 719 mm), in denen 0,655 Millimol CO_2 und 0,485 Millimol H_2 ermittelt wurden. In der Lösung — als $NaHCO_3$ — waren 3,585 Millimol CO_2, im ganzen also 4,24 Millimol CO_2. Alkohol wurde nicht gefunden.

Die flüchtigen Säuren, 5,78 Millimol, bestanden zu 1,24 Millimol aus *Ameisensäure*, zu 4,54 Millimol aus *Essigsäure*. Die Ätherextraktion lieferte 130,9 mg nicht reine *Bernsteinsäure* vom Schmelzp. 181°; das ist rund 1 Millimol.

Die Bildung dieses einen Millimols Bernsteinsäure verlangt den Zerfall von 2 Millimol Oxalessigsäure unter Bildung von $4CO_2$ und $2CH_3.CO_2H$. Der Zerfall des vierten Millimols Oxalessigsäure würde je 1 Millimol CO_2, Ameisensäure und Essigsäure ergeben.

Darnach:	Bernsteinsäure	CO_2	$CH_3.CO_2H$	H_2CO_2
Ber.	1	5	3	1
Gef.	1	4,24	4,54	1,24

Diese Bilanz ist nicht befriedigend. Sie wird durch die noch folgenden Versuche mit Hefe ergänzt.

Die bakterielle Zersetzung von Brenztraubensäure. 5,25 Millimol Natrium-pyruvat wurden mit Bakterien, die nach 17 Stunden geerntet waren (Trockengew. 51,2 mg) in 150 ccm Lösung unter Luftausschluß 12 Stunden lang bei Raumtemperatur in Reaktion gebracht; die Flasche wurde nicht geschüttelt. Von der umgesetzten Brenztraubensäure waren 1,55 Millimol nicht in Reaktion getreten (als Dinitrophenylhydrazon bestimmt). Aus den umgesetzten 3,7 Millimol wurden erhalten: CO_2 1,83, H_2CO_2 0,61, Essigsäure 2,56 Millimol. Durch Ätherextraktion isolierte man 93 mg öliger Säuren, in denen weder Brenztraubensäure noch Milchsäure nachzuweisen war. Sie sind noch näher zu untersuchen.

Versuche mit Hefe.

Die anaerobe Umsetzung von Fumarat kam nur zustande, wenn sich in der Hefe, die vorher ohne mikroskopisch erkennbare Infektion 20—24 Stunden lang unter Sauerstoff geschüttelt („verarmt") war, die im vorhergehenden Abschnitt isolierten Bakterien, wahrscheinlich aus Sporen, entwickelt hatten. Hefe, die keimfrei geblieben war, reagierte niemals mit Fumarsäure. Wenn die Fumarsäure umgesetzt war, war stets reichliche Bakterienbildung festzustellen. Das Arbeiten in toluolgesättigtem Wasser genügte nicht, die Entwicklung der Bakterien hintanzuhalten, wie es andererseits auch beim normalen Arbeiten ohne irgendwelche besonderen antiseptischen Maßnahmen von außen her zu keiner Infektion kam, wenn deren Träger nicht schon in der Hefe vorhanden waren. Ob dies der Fall war oder nicht, war vom Zufall abhängig.

Zum Beweis dafür, daß die Bakterien aus der Hefe stammen und sich gerade in Fumaratlösung anaerob entwickeln, wurde steril entnommene Hefe unter sterilen Bedingungen auf Hefewasser übergeimpft, in dem nach 24 Stunden die bekannten Bakterienformen zu beobachten waren. In reiner Fumaratlösung kam es mit einem in sie eingeführten Tropfen innerhalb 12 Stunden zu starker Trübung.

Für die Ansätze mit keimhaltiger Hefe, die der Bilanz wegen mitgeteilt werden, gelten die gleichen Versuchsbedingungen, wie sie beschrieben sind.

Auf 10 Millimol Fumarat in 200 ccm Wasser kam eine 10-proc. Suspension von verarmter Hefe — Schüttelzeit 20 Stunden, Trockengewicht 1—1,5 g — zur Anwendung. Einwirkungsdauer bei 20° 25 bis 30 Stunden. Nach 8 Stunden war auch in Ansätzen, die am Ende des Versuchs keine Fumarsäure mehr enthielten, diese kaum verändert und noch keine oder nur sehr wenig Bernsteinsäure entstanden, ein Beweis, daß die Zeit für die Entwicklung der Bakterien noch nicht ausgereicht hatte. Es waren nach 25—30 Stunden entstanden aus:

	I	II	III
Millimol Fumarsäure	34,5	10,0	10,0
„ Bernsteinsäure	15,4	5,3	4,4.

Der Ansatz III, der analytisch durchgearbeitet wurde, lieferte 2,36 Millimol Ameisensäure, 4,1 Essigsäure, 7,82 CO_2, 1,08 Alkohol. Von den 40 C-Atomen der 10 Millimol Fumarsäure sind 38,14 wiedergefunden.

Legt man die gefundene Ameisensäure der Spaltung der neben der Bernsteinsäure (50 Proc.) primär gebildeten Oxalessigsäure (50 Proc.) zugrunde, so sind von dieser (5 Millimol) 2,36 in H_2CO_2, CO_2 und Essigsäure zerfallen. Es bleiben für die Spaltung in 2 CO_2 und Acetaldehyd (= Alkohol + Essigsäure/2) 2,64 Millimol Fumarsäure, die 5,28 Millimol CO_2 und je 1,32 Millimol Alkohol und Essigsäure liefern müßten. Von der Gesamtkohlensäure bleiben hierfür 7,82—2,36 = 5,46 (ber. 5,28) Millimol, von der Essigsäure 4,1—2,36 = 1,74 (ber. 1,32) übrig, eine befriedigende Übereinstimmung. Der Wert für den Alkohol (1,08 statt 1,32) ist etwas zu niedrig.

Durch $^m/_{1000}$-Cyanid wird die Reaktion nicht merklich gehemmt. Aus 17,2 Millimol waren nach 40 Stunden 7,05 Millimol Bernsteinsäure entstanden. $^m/_{200}$-Cyanid hemmt jedoch die Entwicklung der Bakterien

sehr stark. In der gleichen Zeit isolierte man mit der gleichen Hefe aus 5 Millimol Fumarat nur 0,51 Millimol Bernsteinsäure.

Der Einfluß von Alkohol und Essigsäure auf die Umsetzung der Fumarsäure.

Es war daran zu denken, daß die Hydrierung der Fumarsäure auch durch andere Wasserstoffdonatoren als Äpfelsäure erfolgen könne, etwa durch Alkohol, der dabei zu Acetaldehyd dehydriert würde. Der Versuch schließt eine solche Möglichkeit aus.

5 Millimol Fumarat wurden unter den üblichen Bedingungen zusammen mit 5,4 Millimol Alkohol bei Luftausschluß 43 Stunden lang unter Schütteln der Einwirkung von verarmter Hefe (1,75 g Trockengewicht) überlassen.

Es wurden gefunden in Millimol: 4,16 CO_2, 2,56 Essigsäure, 0,64 Ameisensäure, 2,64 Bernsteinsäure, 7,01 Alkohol. Zieht man den offenbar nicht von der Reaktion erfaßten, zu Anfang zugesetzten Alkohol (5,4 Millimol) ab, so sind 1,61 Millimol entstanden. Bilanz: 5 — 2,64 = 2,36 Millimol Fumarsäure sind (über die Äpfelsäure) zu Oxalessigsäure dehydriert worden. Davon sind 0,64 Millimol in ebensoviele Millimol Ameisensäure, CO_2 und Essigsäure zerfallen. Der Rest 2,36 — 0,64 = 1,72 Millimol Oxalessigsäure sollte 3,44 Millimol CO_2 und je 0,86 Millimol Essigsäure und Alkohol liefern.

	CO_2	Essigsäure	Alkohol
Ber.	4,08 (3,44 + 0,64)	1,48	0,86
Gef.	4,16	2,56	1,61.

Erhöhte Fumaratkonzentration ($^m/_{10}$—$^m/_{20}$) verlangsamt die Umsetzung. Bei einem solchen Versuch konnte *l-Äpfelsäure* gefaßt werden.

In mehreren Ansätzen wurde gefunden, daß *Acetat* schon in geringer Konzentration die anaerobe Zerfallsreaktion der Fumarsäure sehr stark hemmt.

Der oben beschriebene Versuch, bei dem zu Anfang Alkohol hinzugefügt wurde, wurde zu gleicher Zeit mit der gleichen Hefe unter Zusatz von 5 Millimol Na-Acetat durchgeführt. Nach 43 Stunden waren 1,81 Millimol CO_2, 5,04 Millimol Essigsäure und 0,21 Millimol Alkohol zu ermitteln. Es hatte also praktisch keine Reaktion stattgefunden.

Eine ähnliche Wirkung trat mit *Acetaldehyd* ein, der in einem dritten Parallelversuch geprüft wurde. Der Zusatz

betrug ebenfalls 5 Millimol. Nach 43 Stunden waren 2,27 Millimol CO_2, 2,34 Millimol Essigsäure und 4,06 Millimol Alkohol entstanden.

Die anaerobe Reaktion der Äpfelsäure.

Wir geben zuerst einen durchanalysierten Ansatz mit 10 Millimol *l-Malat* wieder. Hefe-Trockengewicht 0,58 g. Einwirkungsdauer 40 Stunden.

Reaktionsprodukte in Millimol: Bernsteinsäure 4,5, CO_2 7,78, Essigsäure 3,6, Alkohol 1,09, Ameisensäure 1,92.

Unter der Annahme, daß auch hier wieder die Hälfte der Äpfelsäure (über Fumarsäure) zuerst zu Oxalessigsäure dehydriert wurde, leitet sich aus den ermittelten 1,92 Millimol Ameisensäure ein Teilzerfall der Oxalessigsäure ab, der neben der Ameisensäure noch je 1,92 Millimol CO_2 und Essigsäure liefert. Für die Spaltung der übrigen 3,08 Millimol Oxalessigsäure werden erwartet 6,16 Millimol CO_2 und je 1,54 Millimol Essigsäure und Alkohol. Für CO_2 bleiben übrig 7,78—1,92 = 5,86 (statt 6,16) Millimol, für Essigsäure 3,6—1,92 = 1,68 (statt 1,54) Millimol. An Alkohol (1,09 statt 1,54 Millimol) wird wieder zu wenig gefunden.

Mit derselben Hefe (Ro 4, Trockengewicht 0,58 g), mit der der beschriebene Versuch mit l-Äpfelsäure durchgeführt war, wurde gleichzeitig unter genau den gleichen Bedingungen wie dort *d,l-Äpfelsäure* zur Umsetzung gebracht. Der Umsatz war erheblich geringer.

Es wurden gebildet in Millimol: 2,80 Bernsteinsäure, 2,73 CO_2, 2,40 Essigsäure, 0,92 Ameisensäure, 1,20 Alkohol.

Zusammen mit der Bernsteinsäure, die nachher durch heiße Permanganatoxydation von ihr befreit wurde, befand sich im Ätherextrakt optisch aktive, rechtsdrehende Äpfelsäure.

Dies wird durch einen weiteren Versuch mit einem andern Hefestamm (P 6) belegt.

Es wurden 6,0 Millimol d,l-Malat mit verarmter Hefesuspension (Trockengew. 0,07 g) 41 Stunden lang anaerob zur Einwirkung gebracht. Es waren entstanden in Millimol: 1,36 Bernsteinsäure, 3,17 CO_2, 3,04 Essigsäure, 0,24 Ameisensäure.

An zweibasischen Säuren waren nach der Titration 2,12 Millimol entstanden, nach der Oxydation mit $^n/_{10}$-$KMnO_4$ blieben 1,36 Millimol Bernsteinsäure übrig. Da in der Kälte kein Permanganat verbraucht wurde, war keine Fumarsäure in dem Gemisch enthalten.

Von der auf 50 ccm aufgefüllten wäßrigen Lösung des Ätherextrakts drehten 2 ccm, mit 2 ccm gesättigter Ammoniummolybdatlösung vermischt, im 2 dm-Rohr — 0,65°. Da die komplexen Molybdate entgegengesetzt den darin gebundenen Oxysäuren drehen, lag also rechtsdrehende Äpfelsäure vor.

Vergärung der Oxalessigsäure durch nicht sterile Hefe.

Wir bringen die analytischen Ergebnisse von 4 in der üblichen Weise durchgeführten Versuchen in der nachstehenden Tabelle. Rund 20 Proc. des Einsatzes sind nicht erfaßt.

Es wurden je rund 0,95 g Hefe (Trockengewicht) verwendet, die 20 Stunden unter Sauerstoff geschüttelt war. Die Reaktion erfolgte unter Luftausschluß. Versuchsdauer 20 Stunden. Eingesetzt in I 5 Millimol, in II—IV 10 Millimol Oxalacetat.

	CO_2	Essigsäure	H_2CO_2	Ätherextrakt	C-Atome einges.	C-Atome gef.
I.	5,02	3,11	1,11	2,22 (Äquiv.)	20	16,79
II.	12,06	5,41	2,91	2,19 „	40	30,17
III.	12,09	6,82	2,86	2,1 „	40	32,79
IV.	11,27	6,58	2,92			

Alkohol war nicht nachzuweisen. Die nichtflüchtigen Säuren des Ätherextraktes bestanden zum größten Teil aus *Bernsteinsäure*, enthielten aber auch ziemlich viel oxydierbare Begleitsubstanz.

M. Crawford dankt dem *Carnegie Trust der schottischen Universitäten* bestens für das ihm gewährte Stipendium.

Lebenslauf.

Am 20. Juni 1912 wurde ich als Sohn des Bezirksamtsekretärs Gottfried Walch in Sulzbach/ Oberpfalz geboren. Nach vierjährigem Besuch der dortigen Volksschule trat ich zunächst in das humanistische Gymnasium in Amberg, 1924 in Regensburg und 1925 in das Ludwigsgymnasium zu München ein, wo ich Ostern 1931 die Reifeprüfung bestand. Seit Sommersemester 1931 studierte ich an der Universität München Chemie. Im Wintersemester 1933/34 legte ich das erste, im Sommersemester 1935 das zweite Verbandsexamen ab. Anschließend begann ich unter der Leitung von Herrn Geheimrat Professor Dr. H.Wieland meine Doktorarbeit, die ich im Juli 1937 zum Abschluss brachte.